Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin
Universitätsklinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kewitz

Die Äthanol-Elimination beim Kaninchen als möglicher In-vivo-Parameter einer akuten Aktivierung hepatischer Oxidasen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:
Keluf Cecilia Chmielewski
aus: Eksjö/Schweden

1996

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin
Universitätsklinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kewitz

Die Äthanol-Elimination beim Kaninchen als möglicher In-vivo-Parameter einer akuten Aktivierung hepatischer Oxidasen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:
Keluf Cecilia Chmielewski
aus: Eksjö/Schweden

Referent: Prof. Dr. med. A. G. Hildebrandt

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Rommelspacher

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17. Januar 1986

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1 EINLEITUNG.....5
1.1 Oxidase-, Oxygenase- und Peroxidasefunktion des Cytochrom P-450.....5
1.2 Stimulierung der Oxidasereaktion durch "Entkopplung" und Induktion.....7
1.3 Voraussetzung zum Nachweis einer Oxidasefunktion in vivo.....7
1.4 Zielsetzung.....8

2 MATERIAL UND METHODEN.....10
2.1 Chemikalien.....10
2.2 Versuchstiere.....10
2.3 Methoden.....10
2.3.1 Behandlung der Versuchstiere.....10
2.3.2 Vorbehandlung mit Phenobarbital.....11
2.3.3 Fruktosebehandlung.....11
2.4 Probengewinnung.....11
2.5 Gaschromatographische Bestimmung des Äthanols.....11
2.6 Berechnung der Meßwerte.....12
2.7 Mathematische Auswertung.....12

3 ERGEBNISSE.....14
3.1 Elimination von Äthanol.....14
3.2 " " " in Gegenwart von Amidopyrin.....14
3.3 " " " " " " Äthylmorphin.....14
3.4 " " " " " " Hexobarbital.....15
3.5 " " " " " " Cyclohexan.....15
3.6 " " " " " " Perfluoro-n-Hexan...15
3.7 " " " " " " Fruktose.....16

Seite

3.8 Beeinflussung der Äthanolelimination durch Vorbehandlung mit Phenobarbital.....16
3.9 Beeinflussung der Äthanolelimination durch Vorbehandlung mit Phenobarbital und in Gegenwart von Hexobarbital.....16

4 DISKUSSION.....21
4.1 Die Elimination von Alkohol.....21
4.2 Die Wasserstoffperoxidbildung in der Leber.....25
4.3 Der Einfluß von "Entkopplern" auf die Elimination von Äthanol.....26

5 ZUSAMMENFASSUNG.....31

6 TABELLEN.....34

7 LITERATURVERZEICHNISS.....40

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die beobachtete Steigerung in vitro der mikrosomalen H_2O_2-Bildung durch verschiedene Pharmaka in vivo darzustellen. Gleichzeitig sollte damit ein Beitrag zur Aufklärung der Interaktion von Fremdstoffen und Alkohol geleistet werden.

1.1 Oxidase-, Oxygenase- und Peroxidasefunktion des Cytochrom P-450

Der oxidative Metabolismus von Fremdstoffen (z. B. lipophilen Arzneimitteln, Steroiden, Cancerogenen und Pestiziden) findet vor allem im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen statt. Er wird über die mischfunktionelle Monooxygenasereaktion des Hämoprotein Cytochrom P-450 katalysiert. Dazu werden NADPH + H^+ und molekularer Sauerstoff benötigt. Die Reaktion des Enzyms mit Sauerstoff läuft unterschiedlich ab, je nachdem ob Cytochrom P-450 Peroxidase-, Oxygenase- oder Oxidaseaktivität entwickelt (8, 27, 43, 74).

Die **peroxidatische Reaktion** von Cytochrom P-450 verläuft nach dem Schema

$$RH + ROOH \xrightarrow{\text{Cytochrom P-450}} ROH + XOH \qquad (8)$$

Die **mischfunktionelle Oxygenasereaktion**, die zu einer Substrathydroxylierung und zur Reduktion von O_2 zu H_2O führt, folgt der Gleichung:

$$RH + NADPH + H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{Cytochrom P-450}} ROH + NADP^+ + H_2O \quad (50).$$

Hierzu gehören unter anderem:

a) die N-Dealkylierung (z. B. von Amidopyrin, Äthylmorphin, Pethidin

und Imipramin) (12, 48, 52),

b) die O-Dealkylierung (z. B. von Codein und Parazetamol) (12, 52),

c) die S-Dealkylierung (z. B. von Chlorpromazin) (12, 52),

d) die Seitenkettenhydroxylierung (z. B. von Hexo- und Phenobarbital) (12, 52),

e) die aromatische Hydroxylierung (z.B. von Benz(a)pyren, Acetanilid, Östradiol, Zoxazolamin und Anilin) (12, 52).

Die **Oxidase-Reaktion** liefert Wasserstoffperoxid (8). Die Reaktion verläuft nach dem Schema:

$$NADPH + H^+ + O_2 \xrightarrow[\text{Flavoproteine}]{\text{Cytochrom P-450}} NADP^+ + H_2O_2$$

Die Oxygenase- und die Oxidasereaktion, die um $NADPH_2$ und O_2 konkurrieren, kann man in der Mikrosomenfraktion, die das fragmentierte endoplasmatische Retikulum enthält, studieren. Ihnen liegt folgendes, teils hypothetisches Schema zugrunde. Erster Schritt in beiden Reaktionen ist die Bildung eines Cytochrom-P-450-Substratkomplexes, der spektrophotometrisch durch ein Absorptionsmaximum bei 385 nm und ein Absorptionsminimum bei 415 nm gekennzeichnet ist; dies wird ein Typ-I-Bindungsspektrum genannt. Ein Typ-II-Bindungsspektrum ist durch ein Absorptionsmaximum bei 430 nm und ein Absorptionsminimum bei 390 - 400 nm gekennzeichnet und wird durch Interaktion von Cytochrom P-450 mit nitrogenen Basen hervorgerufen (12). Durch die Substratbindung wird die Voraussetzung für eine Sauerstoffaktivierung geschaffen, die zu einer Substrathydroxylierung oder zu einer Wasserstoffperoxyd-Bildung führen kann (14, 26, 73, 81, 82). ULLRICH et al. (73, 75, 76) bezeichneten den Vorgang der NADPH-Oxidierung und des O_2-Verbrauches, der nicht zu einer Substrathydroxylierung führt, als 'Entkopplung'. HILDEBRANDT et al. (25 - 27) zeigten jedoch, daß die "Entkopplung" zur stöchiometrischen Bildung von H_2O_2 führen kann, da der reduzierte O_2 auf der Stufe des Wasserstoffperoxids in den Mikrosomen wiedergefunden werden könnte. Der Grad der "Entkopplung" schien sowohl abhängig vom Substrat

als auch von der ausgewählten Tierart zu sein. Induktion stimulierte die Oxidase- und Oxygenasereaktion, änderte aber auch das Verhältnis beider zueinander, was sich enzymkinetisch nachweisen ließ (20, 22, 80).

1.2 Stimulierung der Oxidasefunktion durch "Entkopplung" und Induktion

Als "Entkoppler" wurden primär Substrate bezeichnet, die die Sauerstoffaufnahme durch Bildung eines Enzym-Substratkomplexes stimulierten, die aber durch sterische Hindernisse das Sauerstoffatom nicht inkorporieren konnten. Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, daß der Begriff "Entkopplung" nicht korrekt ist, da er von der Vorstellung ausging, daß nur gekoppelte Hydroxylierung, also mischfunktionelle Oxygenasereaktionen, ablaufen würden. Wahrscheinlicher ist eine Kompetition zwischen der Oxidase- und Oxygenasereaktion; dabei spielt die Begrenzung von elektronenübertragenden Schritten eine wichtige Rolle (23, 30).

Die Stimulierung der Wasserstoffperoxidbildung ist inzwischen in vitro an verschiedenen Tieren, mit verschiedenen Substraten und Induktoren nachgewiesen worden (20, 21, 26, 71, 73, 75). Es ergab sich die Frage, ob dieser Vorgang auch in vivo, d. h. am gesamten Organismus von Bedeutung ist, denn In-vitro-Befunde könnten einen Artefakt darstellen. Wasserstoffperoxid konnte allerdings direkt weder in der intakten Zelle noch im lebenden Organismus nachgewiesen werden. ORRENIUS et al. (37) wiesen allerdings H_2O_2 indirekt durch Titrierung mit Methanol nach. Solche Untersuchungen wurden neuerdings von SIES (persönliche Mitteilung) in Frage gestellt.

1.3 Voraussetzung zum Nachweis einer Oxidasefunktion in vivo

Als indirekter Nachweis von H_2O_2 in vivo könnte die Äthanoloxidation über die peroxidatische Reaktion der Katalase und anderer Peroxidasen, für die H_2O_2 das Co-Substrat darstellt, in Frage kommen.

Diese peroxidatische Katalase-Reaktion mit Äthanol beträgt bei hoher Äthanolkonzentration etwa 10-20 % der Äthanoloxidation (56, 67). Damit könnte diese Reaktion als Parameter für die mikrosomale Wasserstoffperoxidbildung verwendet werden. Voraussetzung dafür ist aber, daß der Katalaseanteil gegenüber den äthanoloxidierenden Enzymen signifikant ist und daß die zugesetzten Substrate diese Enzyme nicht oder wenig beeinflussen.

1.4 Zielsetzung

Zielsetzung der Arbeit ist deshalb, die in vitro nachgewiesene Steigerung der mikrosomalen Wasserstoffperoxidbildung durch die Substrate Amidopyrin, Äthylmorphin, Hexobarbital, Cyclohexan und Perfluoro-n-Hexan in vivo darzustellen.

Da die Äthanolelimination in vivo von mehreren Enzymsystemen abhängig ist, stellt sie eine Überlappung mehrerer Stoffwechselwege dar. Um die Brauchbarkeit des Prüfsystems, d. h. die Ansprechbarkeit auf eliminationsfördernde Effekte zu prüfen, wurde die Wirkung von Fruktose auf den Äthanolmetabolismus untersucht. Fruktose bewirkt eine Änderung des zellulären Redoxzustandes durch verstärkte Reoxidierung von $NADH_2$, das bei der Äthanoloxidation anfällt und stimuliert damit die Alkoholdehydrogenase-abhängige Äthanolelimination (1, 2, 5, 62).

Folgende Aspekte sollten untersucht werden:

1. Welchen Einfluß haben Amidopyrin, Äthylmorphin, Hexobarbital, Cyclohexan und Perfluoro-n-Hexan auf die Äthanolelimination in vivo?

2. Ist die in vitro gefundene Stimulierung der Wasserstoffperoxidbildung durch Zugabe von Aktivatoren der H_2O_2-Bildung (wie Amidopyrin, Äthylmorphin, Hexobarbital, Cyclohexan und Perfluoro-n-Hexan) oder durch Phenobarbitalinduktion auch in vivo durch eine gesteigerte Äthanolelimination nachweisbar?

3. Wird durch Substrate der mischfunktionellen Oxidasen eine Fruktose-abhängige Beschleunigung der Äthanolelimination (positive Kontrolle) beeinflußt?

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien:

Von Merck Darmstadt:
Amidopyrin (MG. 231,1), Äthylmorphinhydrochlorid (MG. 349,9), Äthanol 99,9 % (MG. 46,06)

Von Bayer Leverkusen:
Cyclohexan z. A. (MG. 84,16), Fruktose DAB (MG. 180,16), Hexobarbital-Natrium: Evipan-Natrium (MG. 258), Phenobarbital-Natrium (MG. 232)

Von Kali Chemie Hannover:
Perfluoro-n-Hexan: Flutec PPI
(MG. 338)

2.2 Versuchstiere:

Männliche Hauskaninchen (Bastarde) der Firma Wulf, 3307 Königslutter, mit einem Gewicht zwischen 2,65 und 4,5 kg.

2.3 Methoden

2.3.1 Behandlung der Versuchstiere

Die meisten Tiere wurden eine Woche lang ohne Vorbehandlung gehalten. Wasser und Standarddiät der Firma Altromin wurden nicht limitiert. Die Tiere wurden einzeln in Metallkäfigen mit Bodenrost gehalten.

Die Substanzen wurden in folgender Weise verabreicht:
Zur Herstellung einer 50 %-igen Äthanollösung wurde absoluter Äthanol (99,9 %) in physiologischer Kochsalzlösung (Gewicht/Volumen) gelöst.

Die Tiere bekamen intraperitoneal 5 ml von dieser Lösung pro kg Körpergewicht (KG). Das entspricht einer Dosis von 2,5 g/kg KG. Simultan dazu wurde in äquivalenten Mengen entweder Amidopyrin (6,6 mg/kg KG) oder Äthylmorphin (10 mg/kg KG) oder Hexobarbital (7,4 mg/kg KG) intraperitoneal gespritzt. Die Konzentrationen bezogen sich auf in vitro effektive Mengen. Bei Cyclohexan (42 mg/kg KG) und Perfluoro-n-Hexan (169 mg/kg KG), die ebenfalls intraperitoneal und getrennt injiziert wurden, mußte den In-vitro-Versuchen entsprechend eine höhere Dosis gegeben werden.

2.3.2 Vorbehandlung mit Phenobarbital

Phenobarbital-Na wurde in einer Dosis von 50 mg/kg KG in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung einmal täglich eine Woche lang i.p. verabreicht.

2.3.3 Fruktosebehandlung

4 Stunden nach Injektion von 2,5 g Äthanol/kg KG wurde Fruktose in einer Dosis von 0,7 g/kg KG in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. injiziert.

2.4 Probengewinnung

100 µl Blut wurde die ersten beiden Stunden halbstündlich, danach stündlich acht Stunden lang aus der Ohrvene abgenommen.

2.5 Gaschromatographische Bestimmung des Äthanols

Das heparinisierte Vollblut wird im Verhältnis 1:1 mit einer n-Propanollösung (1 mg/ml) verdünnt. Diese Propanollösung dient als interner Standard. Für die Messung wurde ein Gaschromatograph Modell Pye Unicam GCD mit Flammenionisationsdetektor und einer 2,5 m x 2 mm Glassäule

benutzt. Die Säule war mit 20 % Carbowax 20 M auf Chromosorb W 60/80 mesh gefüllt.

Die Ofentemperatur betrug 120°C und die Temperatur des Flammenionisationsdetektors und Einspritzblocks betrug 180°C. Als Trägergas diente Stickstoff 40 ml/min. Für die Flamme wurde ein Durchfluß von 30 ml Wasserstoff/min und 180 ml synthetische Luft/min benutzt. Von dem Blut-Propanol-Gemisch wurde 1 µl mit einer 50 µl Hamilton-Spritze 705 direkt in den Gaschromatographen injiziert. Feste Bestandteile des Blutes wurden von einem Glaswollestopfen, der am Anfang der Säule angebracht war, zurückgehalten (35,36).

2.6 Berechnung der Meßwerte

Zur Auswertung wurde die Peakhöhe des Äthanols und Propanols der Gaschromatogramme gemessen. Die Äthanolkonzentration wurde aus dem Quotienten der Äthanol- zu Propanol-Peakhöhe mit dem Eichfaktor der jeweiligen Eichkurve multipliziert, die täglich aus 10, 20, 40, 100 mM Äthanollösungen erstellt wurde, bestimmt. Die Retentionszeiten für Äthanol und Propanol betrugen 3 Minuten bzw. 4,4 Minuten.

2.7 Mathematische Auswertung

Die Eliminationsgeschwindigkeit und das Verteilungsvolumen von Äthanol wurden nach den folgenden Formeln durch nicht lineare Regressionsanalyse (39) iterativ berechnet:

$$V_D = \frac{\text{Dosis}}{C_o}$$

$$C = C_o\,(1-e^{kit}) - \beta t$$

hierbei bedeuten

C = Blutkonzentration (mmol/l)

C_o = theoretische Anfangskonzentration (mmol/l)

k_i = Invasionskonstante (h^{-1})

ß = Eliminationskonstante (h^{-1})

V_D = Verteilungsvolumen (l/kg)

Für die einzelnen Kollektive wurden der Mittelwert und die Standardabweichung (S.D.) berechnet. Der statistische Vergleich der Gruppen untereinander wurde mit Hilfe des t-Testes vorgenommen. Hierzu wurde jede Kurve einzeln ausgewertet und Mittelwerte der errechneten Größen V_D, ß, k_i und C_o gebildet (Tabelle 1, 2, 4, 5). Die Abbildungen zeigen die berechneten Kurven aus den Medianwerten des jeweiligen Kollektivs.

3. Ergebnisse

3.1 Elimination von Äthanol

Nach intraperitonealer Verabreichung von 2,5 g Äthanol/kg KG an acht unbehandelte männliche Kaninchen zeigt sich im untersuchten Bereich eine konzentrationsunabhängige Eliminationskinetik nullter Ordnung (Abb. 1a,Tab. 3). Die Invasionskonstante beträgt 2,14 $\pm$ 0,84 mM/h, das Verteilungsvolumen 1,17 $\pm$ 0,21 l/kg KG und die Eliminationsgeschwindigkeit 3,43 $\pm$ 1,56 mM/h. Das Blutspiegelmaximum beträgt 40,7 $\pm$ 5,6 mmol/l und die theoretische Anfangskonzentration 47,5 $\pm$ 7,7 mmol/l (Tab. 1, 2).

3.2 Elimination von Äthanol in Gegenwart von Amidopyrin

Eine simultane intraperitoneale Injektion von 6,6 mg Amidopyrin/kg KG und Äthanol (Abb. 1b, Tab. 1 - 3) verändert die Eliminationsgeschwindigkeit, das Verteilungsvolumen, das Blutspiegelmaximum sowie die theoretische Anfangskonzentration. Die Invasionskonstante bleibt unbeeinflußt. Die theoretische Anfangskonzentration ist signifikant erhöht mit 61,8 $\pm$ 6,5 mmol/l ($p < 0,005$). Dementsprechend ist das Verteilungsvolumen unter der Gabe von Amidopyrin mit 0,89 $\pm$ 0,10 l/kg signifikant kleiner ($p < 0,01$). Die Eliminationskinetik unterliegt einer Kinetik nullter Ordnung. Sie beträgt 5,89 $\pm$ 1,10 mM/h und ist signifikant erhöht ($p < 0,005$). Das Blutspiegelmaximum ist mit 51,7 $\pm$ 3,3 mmol/l ebenfalls signifikant höher ($p < 0,001$). Das untersuchte Kollektiv bestand aus 7 Tieren ($n = 7$).

3.3 Elimination von Äthanol in Gegenwart von Äthylmorphin

Die Gabe von Äthylmorphin (Abb. 1c, Tab. 1-3) vermindert das Verteilungsvolumen signifikant auf 0,90 $\pm$ 0,15 l/kg KG ($p < 0,02$) und erhöht die theoretische Anfangskonzentration auf 61,9 $\pm$ 10,4 mmol/l

($p < 0,01$) ($n = 7$). Die Eliminationsgeschwindigkeit beträgt hierbei $5,97 \pm 1,21$ mM/h ($p < 0,005$). Das Blutspiegelmaximum ist mit $52,8 \pm 10,1$ mmol/l signifikant erhöht ($p < 0,02$).

3.4 Elimination von Äthanol in Gegenwart von Hexobarbital

Hexobarbital (Abb. 1d, Tab. 1-3) erhöht die Eliminationsgeschwindigkeit signifikant auf $5,55 \pm 1,07$ mM/h ($p < 0,025$) ($n = 5$). Das Verteilungsvolumen, die theoretische Anfangskonzentration sowie das Blutspiegelmaximum sind unter Einfluß von Hexobarbital ähnlich verändert wie durch Amidopyrin, jedoch ohne Signifikanz.

3.5 Elimination von Äthanol in Gegenwart von Cyclohexan

Cyclohexan (Abb. 1f, Tab. 1-3) verkleinert das Verteilungsvolumen auf $0,85 \pm 0,06$ l/kg ($p < 0,005$), vergrößert die theoretische Anfangskonzentration auf $64,3 \pm 4,4$ mmol/l ($p < 0,001$) sowie das Blutspiegelmaximum auf $51,0 \pm 3,8$ mmol/l ($p < 0,005$) ($n = 7$). Die Eliminationsgeschwindigkeit ist mit $5,94 \pm 0,52$ mM/h ($p < 0,005$) signifikant erhöht.

3.6 Elimination von Äthanol in Gegenwart von Perfluoro-n-Hexan

Zusatz von Perfluoro-n-Hexan (Abb. 1e, Tab. 1-3) hat weder einen Einfluß auf die Eliminationsgeschwindigkeit, das Verteilungsvolumen, die theoretische Anfangskonzentation noch auf das Blutspiegelmaximum ($n = 5$).

Sämtliche untersuchten Substrate übten keinen Einfluß auf die Invasionskonstante aus.

3.7 Elimination von Äthanol in Gegenwart von Fruktose

Der Einfluß von Fruktose, die den intrazellulären Redoxzustand verändert, wird untersucht, um eine positive Kontrolle der unter anderen Substrateinflüssen gemessenen beschleunigten Äthanolelimination zu haben. Wird Fruktose 4 Stunden nach der Äthanolinjektion intraperitoneal verabreicht, so kann eine kurzfristige lineare Beschleunigung über einen Zeitraum von 1,5 - 2 Stunden festgestellt werden. Die Beschleunigung beträgt 7,5 mM/h bzw. 9,7 mM/h. Dieser Effekt wird durch eine Gabe von Amidopyrin weiterhin verstärkt, wodurch der Äthanolabbau um 50 % zusätzlich beschleunigt wird.

3.8 Beeinflussung der Äthanolelimination durch Vorbehandlung mit Phenobarbital

Eine einwöchige Vorbehandlung der Kaninchen mit Phenobarbital verstärkt die Äthanolelimination. Die Eliminationsgeschwindigkeit ist gegenüber 3,43 mM/h bei den Kontrollen fast verdoppelt auf 6,26 $\pm$ 0,64 mM/h ($p < 0,02$) (Tab. 4, Abb. 3b).

3.9 Beeinflussung der Äthanolelimination durch Hexobarbital bei phenobarbitalvorbehandelten Tieren

Da Hexobarbital in Mikrosomen von mit Phenobarbital vorbehandelten Kaninchen eine zusätzliche Stimulierung der H_2O_2-Bildung bewirkt, wird die Äthanolelimination bei mit Phenobarbital vorbehandelten Tieren untersucht, denen simultan mit dem Alkohol Hexobarbital appliziert wird. Hier gelingt es aber nicht, die Elimination weiter zu beschleunigen (Abb. 3c, Tab. 4). Die Eliminationsgeschwindigkeiten bleiben mit 6,26 bzw. 6,08 mM/h nahezu identisch.

Die Phenobarbital-Vorbehandlung erhöhte die theoretische Anfangskonzentration auf 58,6 $\pm$ 4,3 mmol/l ($p < 0,005$). Das Blutspiegelmaximum wird erhöht und das Verteilungsvolumen erniedrigt (Tab. 4-5). In beiden Gruppen wurden jeweils 3 Tiere untersucht.

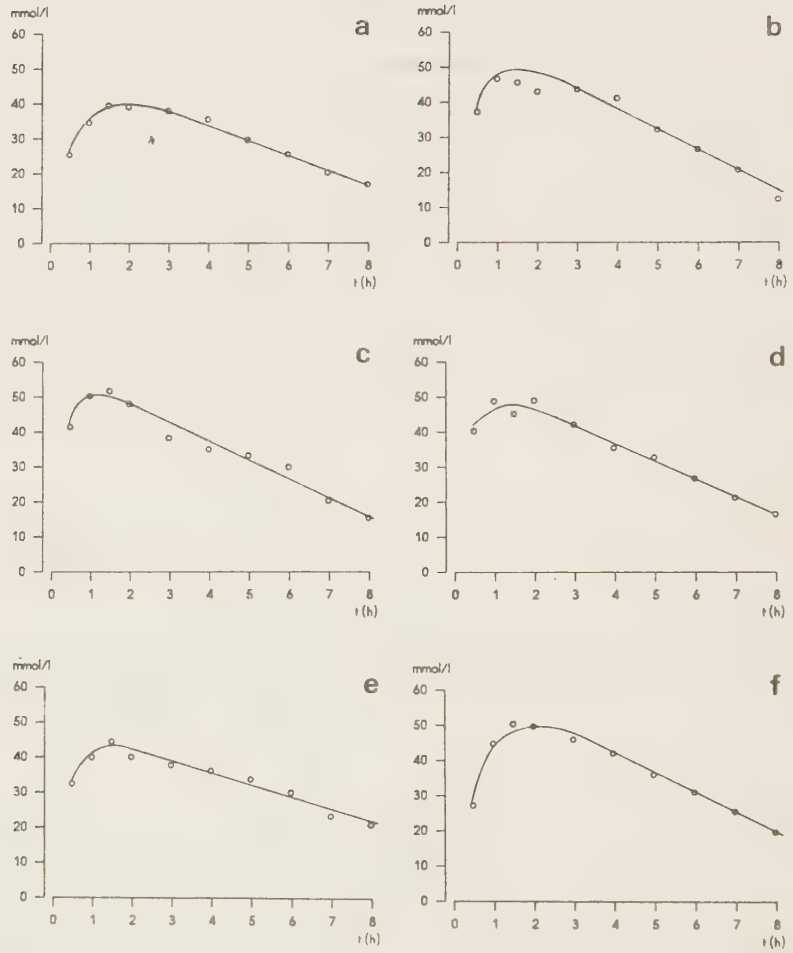

Fig. 1

Einfluß von Amidopyrin, Hexobarbital, Äthylmorphin, Cyclohexan und Perfluoro-n-Hexan auf die Elimination von Äthanol.

a: Kontrolle; b: Amidopyrin; c: Äthylmorphin; d: Hexobarbital; e: Perfluoro-n-Hexan; f: Cyclohexan.

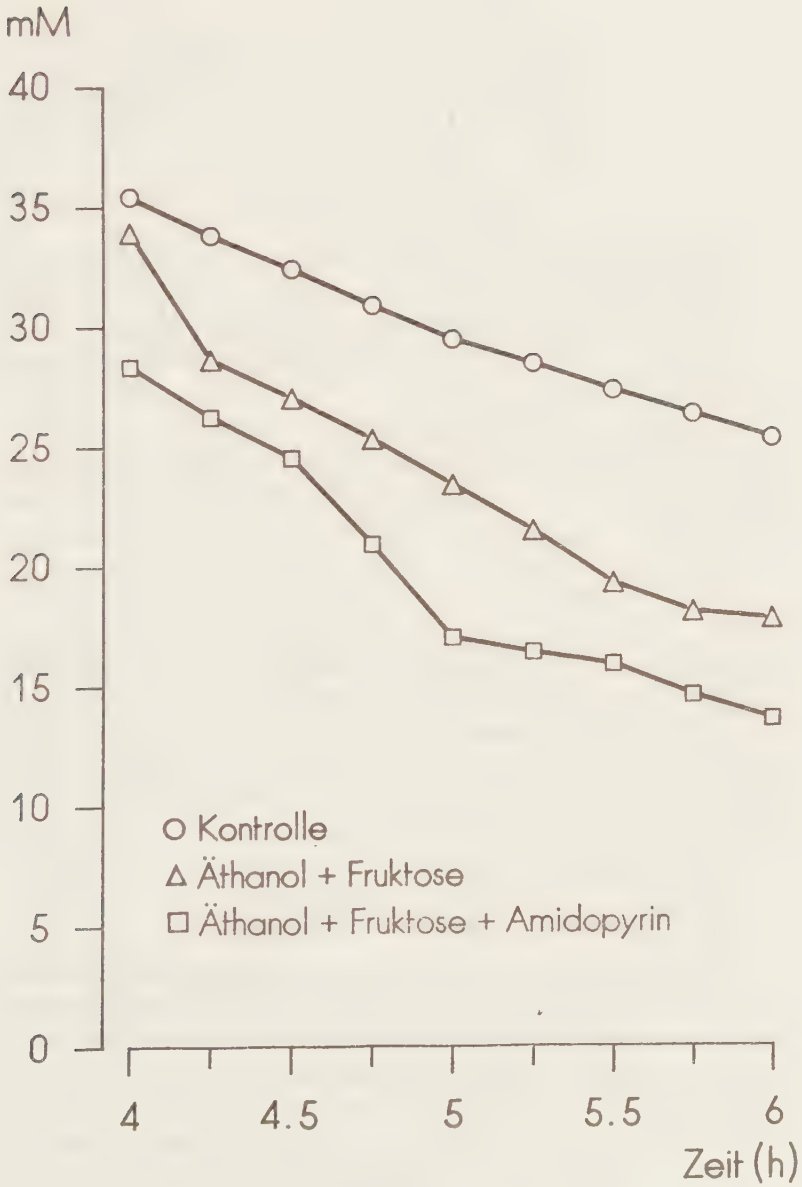

Fig. 2
Äthanolabbau nach Injektion von 0.7 g Fruktose/kg Körpergewicht.

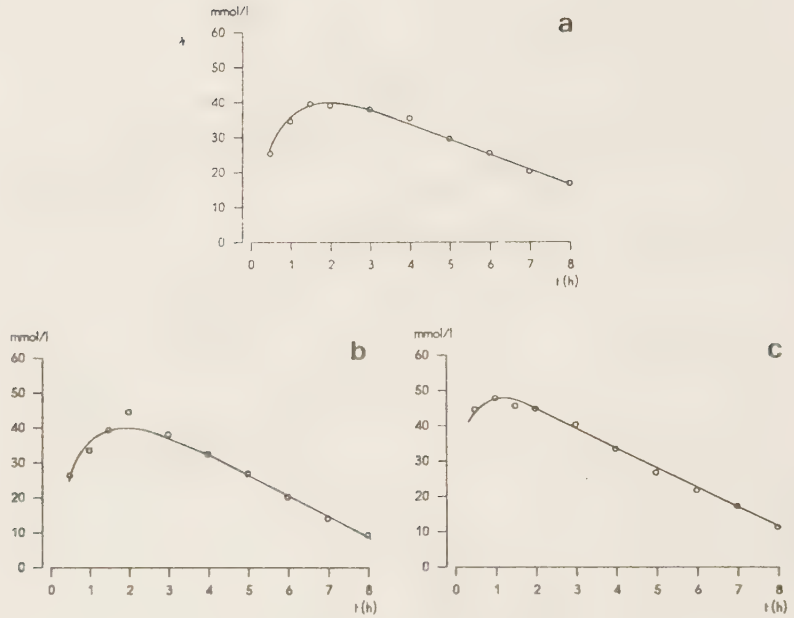

Fig. 3

Einfluß von Phenobarbital (50 mg/kg, 7 Tage) auf die Elimination von Äthanol.

a: Kontrolle; b: Phenobarbitalbehandlung; c: Äthanol + Hexobarbital (7,4 mg/kg) + Phenobarbitalbehandlung

4. Diskussion

4.1 Die Elimination von Alkohol

Bevor Schlüsse über die Eignung der Beeinflussung der Äthanolelimination durch Pharmaka als In-vivo-Parameter einer gesteigerten H_2O_2-Bildung gezogen werden können, muß erst die Äthanolelimination unter Normalbedingungen beschrieben werden.

Die Eliminationskinetik wird als eine Reaktion nullter Ordnung beschrieben. Sie nimmt jedoch bei niedrigen Konzentrationen ($\leq$ 10 mmol/l) einen exponentiellen Verlauf an (1, 50, 60). Entsprechend ist der Äthanolabbau von WIDMARK (83) mit der Formel

$$C_t = C_o - ßt$$

beschrieben worden. C_o ist die theoretische Anfangskonzentration und ß ist eine für jedes Individuum bestimmte Abbaukonstante, die konstitutionell bedingt erscheint. Von dem aufgenommenen Alkohol werden nur 2 - 10 % unverändert durch Lunge, Niere und die Haut ausgeschieden. Alles andere wird in der Leber abgebaut. Die Äthanolelimination verläuft über mehrere oxidative Schritte. Dabei entstehen Acetaldehyd und Essigsäure, die als aktivierte Essigsäure in den Krebszyklus eingeschleust und bis zum Kohlendioxid oxidiert werden.

Es ist davon auszugehen, daß an der Äthanoloxidation die drei Enzymsysteme Alkoholdehydrogenase (ADH), das mikrosomale äthanoloxidierende System (MEOS) und Katalase beteiligt sind (46, 50, 60).

Ein Einfluß von Fremdstoffen kann an einem dieser Enzyme allein oder zusammen mit mehreren erfolgen. Die Eliminierung des Äthanols im Sinne einer Reaktion nullter Ordnung beruht wahrscheinlich auf einer Sättigung der ADH.

Der Hauptteil der Äthanolelimination wird durch ADH katalysiert. Dessen Anteil an der Gesamtoxydation beträgt nach MEZEY (50) 50 %, von LIEBER und THURMAN (43 - 46, 68) werden 75-80 % angegeben. Das Enzym ist ubiquitär vorhanden und befindet sich hauptsächlich im Zytosol des Leberparenchyms. Die Aktivität der extrahepatischen Äthanoloxidation beträgt 5-10 % der hepatischen und verteilt sich auf Nieren, Gehirn, Testes und die Mukosa des Magens und des Dünndarms (4, 46, 50). ADH benötigt NAD als Co-Ferment und hat ein Wirkungsoptimum in vitro bei pH 10-11 (4, 46). Der K_m-Wert dieser Reaktion beträgt 0,5-2 mM in vitro. Es handelt sich um mehrere Isoenzyme, die außer der Dehydrierung von aliphatischen primären und sekundären zyklischen und aromatischen Alkoholen, u. a. auch die Aldehydismutation, Retinoloxidierung, Steroiddehydrierung und Fettsäureoxidation katalysieren (4, 46). Außerdem besitzt diese Enzymgruppe Isomerase-, Transaminase- und Peroxidaseaktivität (15). Die Reaktion verläuft nach der Formel

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \xrightarrow{ADH} CH_3CHO + NADH + H^+ . (4)$$

Die Reaktion wird durch Pyrazol, Imidazol und Methylpyrazol gehemmt. Eine Produkthemmung ist beschrieben worden (10). Ein Mangel an NAD^+, durch zu geringe Reoxidaton von NADH in der Atmungskette, begrenzt die Reaktionsgeschwindigkeit. Zu wenig Transportkapazitäten wie z. B. über den Malat-Aspartat- oder α-Glycero-Phosphat-Shuttle für $NAD^+/NADH_2$ durch die Mitochondrienwand, die für dieses Phosphonukleotid impermeabel ist, würden zu einem NAD-Defizit führen. Das würde auch eine erschwerte Dissoziation des ADH-NADH-Komplexes bewirken (46, 60).

Nach Vorbehandlung von Tieren mit z.B. Äthanol, Phenobarbital und Methylcholanthren haben ORME-JOHNSON (54) und LIEBER (43 - 46) bei höheren Äthanolkonzentrationen eine beschleunigte Äthanoloxidation festgestellt. Für diese Beschleunigung machten sie ein Enzymsystem MEOS oder MAOS (das mikrosomale äthanol- bzw. alkoholoxidierende System) verantwortlich (24, 26, 49, 51, 61, 64). Es ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, benötigt NADPH und molekularen Sauerstoff und ist hemmbar durch Kohlenmonoxid. MEOS ist chromatographisch aufgetrennt

worden und enthält als wichtigste Komponenten Cytochrom P-450, NADPH-Cytochrom c-Reduktase und ein Phospholipid, Phosphatidylcholin (44, 47). Die Reaktion verläuft nach dem Schema:

$$CH_3CH_2OH + NADPH + H^+ + O_2 \xrightarrow{MEOS} CH_3CHO + NADP^+ + 2\,H_2O$$

Der K_m- Wert liegt bei 8,8 mM mit einem Aktivitätsoptimum bei einem pH-Wert von 7,4. LIEBER (44, 45) schätzt, daß 20-25 % der Äthanoloxidation über MEOS katalysiert werden. Das System ist induzierbar und soll ähnlich wie bei Arzneimitteln und Fremdstoffen für die Toleranzentwicklung mitverantwortlich sein (64). Es wird nicht oder nur geringfügig durch den ADH-Hemmstoff Pyrazol sowie die Katalase-Hemmstoffe Natriumazid, Natriumcyanid und 1,2,4-Aminotriazol gehemmt. Außerdem ist MEOS, im Gegensatz zur Katalase, imstande, auch höhere Alkohole zu oxidieren wie Propanol, Butanol und Pentanol (53, 65). Das System zeigte jedoch viele Ähnlichkeiten mit dem Katalase-System. Seine Existenz ist deswegen mehrfach bestritten worden (1, 33, 34, 56 - 58, 68 - 70, 77, 80). TESCHKE und SCHULMAN war es jedoch gelungen, die beiden Systeme voneinander abzugrenzen (66, 67, 77) und von KOOP et al. (40, 41) wurde ein Cytochrom $P\text{-}450_{LM\ 3a}$ spektrophotometrisch nachgewiesen, das durch Äthanolgabe induziert wird. Obwohl es nur 5 % von dem gesamten mikrosomalen Cytochrom P-450 ausmacht, katalysiert es in Äthanol-behandelten Tieren bis zu 75 % der Äthanoloxidation. Mit Hilfe eines Radioimmunassay wurde seine Menge in unbehandelten Tieren mit 0,04 nmol/mg Protein und 0,10 nmol/mg Protein nach Äthanolbehandlung festgestellt.

Der Anteil der Katalase an der Äthanoloxidation wird von THURMAN und Videla et al. mit 20 % (67, 78) und von OSHINO mit etwa 10 % (57) angegeben; sie spielt jedoch nur eine Rolle bei höheren Äthanolkonzentrationen (27). RAHIMTULA et al. (59) behaupteten sogar, daß eher Cytochrom P-450 als Katalase für die wasserstoffperoxidabhängige Äthanoloxidation zuständig ist. Auch BERRY et al. (1) räumen der Katalase eine sehr geringe Rolle ein, die nur unter besonderen Umständen zum Tragen kommen könnte. Katalase ist ein Hämoprotein und kommt hauptsächlich in

den Peroxisomen der Leber und der Niere gebunden vor. In freier Form existiert sie auch in den Erythrozyten. Das Enzym ist hemmbar durch Natriumazid, Natriumcyanid, 1,2,4-Aminotriazol und Pyrazol (16, 67).

Bei der katalatischen Reaktion der Katalase werden 2 Wasserstoffperoxidmoleküle in Wasser und Sauerstoff zerlegt. Die Reaktion verläuft über eine Intermediärverbindung nach dem Schema:

$$\text{Katalase} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Katalase-}H_2O_2 \text{ (Komplex I)}$$
$$\text{Katalase-}H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow \text{Katalase} + 2\,H_2O + O_2$$

Komplex I stellt die aktive Form der Katalase dar.

Die peroxidatische Reaktion der Katalase ist von KEILIN und HARTREE (38) beschrieben worden. Diese Reaktion ist mit einer Substratoxidation gekoppelt. OSHINO et al. (56, 57) haben untersucht, unter welcher Bedingung Katalase katalatische bzw. peroxidatische Aktivität entwickelt. Es wurde gezeigt, daß die Reaktionsart vom Ausmaß der Wasserstoffperoxidbildung, der Katalase-Hämkonzentration und der Äthanolkonzentration abhängt. Je höher die H_2O_2-Bildungsgeschwindigkeit, Hämkonzentration und Alkoholkonzentration sind, desto größer wird der zu erwartende peroxidatische Anteil an der Gesamtreaktion sein. Der Katalasegehalt der Leber ist abhängig von Tierart, Ernährungszustand, Vorbehandlung und unterliegt zeitlichen Schwankungen.

Von COHEN und CEDERBAUM (7) wurde ein zusätzlicher Reaktionsweg für den Äthanolmetabolismus vorgeschlagen. Hydroxy- sowie Perhydroxy-Radikale können mit primären aliphatischen Alkoholen reagieren und Hydroxyalkylradikale bilden. Diese Hydroxyalkylradikale bilden Aldehyde als Alkoholmetaboliten durch Dismutation oder Verlust eines Elektrons an ein Eisenchelat. Alkohol wirkt hier als Radikalscavenger. Die Quelle der mikrosomalen Hydroxylradikalbildung könnte NADH-Cytochrom b_5-Reduktase oder NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase sein.

Wasserstoffperoxid dient als Precursor für Hydroxylradikale, die über die HABER-WEISS-Reaktion:

$$^{\cdot}O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$$

oder die Fenton-Reaktion

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$$

gebildet werden können. Deswegen erklären INGELMAN-SUNDBERG et al. (32) die mikrosomale Äthanoloxidation des Cytochrom P-450 $_{LM\ 2}$ durch die Fähigkeit über die Haber-Weiss-Reaktion Hydroxy-Radikale zu bilden.

4.2 Die Wasserstoffperoxidbildung in der Leber

Die Wasserstoffperoxidbildung in der Leber ist von gewählter Tierart, Induktion und Substratzugaben abhängig. Sie findet in den Peroxisomen im endoplasmatischen Retikulum statt. Wasserstoffperoxid entsteht bei verschiedenen Oxidasereaktionen, unter anderem bei der NADPH-Oxidase-, Uricase-, Xanthinoxidase-, Glucoseoxidase-, Aminosäureoxidase- und Fettsäureoxidase-Reaktion (55).

Die mikrosomale Wasserstoffperoxidbildung beruht nach THURMAN (68) zu 2/3 auf NADPH-Oxidase und zu 1/3 auf Autooxidation des Cytochrom P-450. Substrat- und NADPH-Zugaben sowie das Verhältnis von Substrat- und NADPH-Konzentration zueinander beeinflussen das System (30). Entscheidend in diesem Zusammenhang ist die wiederholt angesprochene Beobachtung, daß die mikrosomale Wasserstoffperoxidbildung stimulierbar ist. Das ist dann der Fall, wenn Cytochrom P-450 mehr Oxidase- als Oxygenaseaktivität entwickelt (20).

Abhängig ist dieser Vorgang von der Induktion durch Vorbehandlung mit Stoffen, die zur Vermehrung arzneimittelabbauender Enzyme führen, wie Phenobarbital, 3-Methylcholanthren und Pregnenolon-16α-Carbonitril und Äthanol (42, 71, 78), vom Zusatz von Substraten der mischfunktionellen Oxidase wie Äthylmorphin, Hexobarbital, Benz(a)pyren, einigen zyklischen und perfluorierten Kohlenwasserstoffen und Flavonoiden (31, 72, 73, 75) und von der Tierart (22).

TJOE-REINHARDT (71) hat die Wasserstoffperoxydbildung bei Kaninchen und Meerschweinchen in vitro untersucht und gefunden, daß die Wasserstoffperoxidbildung bei Kaninchen durch Phenobarbital- und Pregnenolon-16α-Carbonitril-Vorbehandlung stimuliert wird. Diese Stimulierung kann durch Zugabe von Amidopyrin zum Mikrosomeninkubat noch verstärkt werden.

Hexobarbitalzusatz (20, 21) führt bei verschiedenen Tierarten zu einer stimulierten Wasserstoffperoxidbildung, die direkt proportional zur Hexobarbital- und NADPH-Konzentration ist und mit der Substratbindung an Cytochrom P-450 korreliert und durch das Verhältnis von Substrat, NADPH und Cytochrom P-450 beeinflußt wird (22, 30). Zur Erklärung wurde postuliert, daß das Substrat durch Komplexbildung eine bessere Interaktion zwischen dem Redoxprotein Cytochrom P-450 und den Reduktasen bewirkt, was zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und damit zu einer höheren Wasserstoffperoxidbildung führt (28, 30). Es ist anzunehmen, daß durch die Aufnahme eines zweiten Elektrons, das bei der Oxidasereaktion entweder von NADPH oder vom Substrat selber geliefert werden kann (29, 30), die Reaktion limitiert wird.

4.3 Der Einfluß von "Entkopplern" auf die Elimination von Äthanol

In der vorliegenden Arbeit ist versucht worden, diese in vitro erzielten Ergebnisse in vivo zu bestätigen. Die theoretische Vorstellung der Äthanolelimination als möglicher In-vivo-Parameter der hepatischen Oxidaseaktivität beruht auf den folgenden Überlegungen und Voraussetzungen:

1. Das in vivo gebildete Wasserstoffperoxid muß in einer möglichen peroxidatischen Katalase-Reaktion geschwindigkeitsbestimmend sein.
2. Der Anteil an mikrosomal gebildetem Wasserstoffperoxid muß zur gesamten Wasserstoffperoxidbildung der Leber signifikant sein.
3. Der Anteil an mikrosomal gebildetem Wasserstoffperoxid an der Äthanoloxidierung muß trotz der dominierenden Rolle der ADH und

Mitbebeiligung anderer Enzyme erkennbar sein (20). Nur wenn diese Bedingungen erfüllt sind, müßte als Parameter für eine stimulierte H_2O_2-Bildung die Äthanolelimination unter dem Einfluß von entkoppelnden Substanzen beschleunigt werden.

Die hier vorgelegten Ergebnisse haben eine lineare konzentrationsunabhängige Äthanolelimination gezeigt, die sich durch die Substrate Amidopyrin, Äthylmorphin, Hexobarbital, Cyclohexan sowie durch Vorbehandlung mit Phenobarbital steigern ließ. Da der Blutäthanolspiegel durch die gleichen Substrate erhöht wurde, war eine Verminderung des Verteilungsvolumens von Äthanol zunächst anzunehmen. Fruktose bewirkt dann eine kurzfristige Beschleunigung der Äthanoloxidation, wenn sie während der Eliminationsphase appliziert wurde.

Perfluoro-n-Hexan übte keinen Einfluß auf die Äthanolelimination aus. Ähnliche Versuche sind auch mit Meerschweinchen durchgeführt worden (20).

Die Befunde sind nicht eindeutig im Sinne einer gesteigerten H_2O_2-Bildung zu erklären. Die beschleunigte Äthanolelimination könnte zum einen ihren Grund in einer gesteigerten peroxidatischen Äthanoloxidation als Folge der Stimulierung der Wasserstoffperoxidbildung haben, die in vitro nach Inkubation von Hexobarbital mit Kaninchenmikrosomen nachgewiesen (23) und durch Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital ebenfalls erreicht worden ist. Für die anderen untersuchten Stoffe ist bei Meerschweinchen mit Äthylmorphin und bei Ratten mit Cyclohexan und Perfluoro-n-Hexan ein ähnlicher Effekt in vitro gefunden worden (71 - 73, 75). Bei Kontrolltieren gelang der Nachweis einer gesteigerten Wasserstoffperoxidbildung in vitro nur nach Zusatz von Hexobarbital und Benzphetamin zu Mikrosomen (71).

Zum anderen könnte der Äthanolmetabolismus durch eine direkte Interaktion des Substrates mit ADH verändert werden, wie es für Äthylmorphin beschrieben worden ist (20).

Eine direkte Beeinflussung der ADH ist besonders durch Veränderung des

Redoxzustandes von NAD^+/NADH möglich. Ein Anstieg des NAD^+/NADH-Quotienten korreliert direkt mit der Beschleunigung der Äthanolelimination (17), wie z. B. unter Fruktosegabe, aber auch eine Vorbehandlung mit Phenobarbital oder Hexobarbital kann zu einer verstärkten Oxidation von NADH führen. Der gleiche Mechanismus ist für die verzögerte Elimination von Äthanol beim Fasten verantwortlich, weil dadurch die Reoxidation des NADH verlangsamt wird (1, 2, 3, 4, 5). Dieser Effekt ist mit Fruktose voll reversibel. Die Äthanolelimination wird indirekt durch Erhöhung des Energieverbrauches der Leber bei der Umwandlung von Fruktose in Glukose stimuliert. Folglich wird die oxidative Phosphorylierung erhöht und dadurch steigt auch die Kapazität der Atmungskette, das bei der Äthanoloxidation entstandene NADH zu reoxidieren (6, 7, 62, 36). Außerdem wurde die zytoplasmatische NADH-Oxidierung durch die reduzierten Produkte des Fruktosestoffwechsels die als Wasserstoffakzeptoren dienen könnten und auch als Komponenten in den α-Glycero-Phosphat-Shuttle einbezogen werden, unterstützt. Zusätzlich könnte die zytoplasmatische NADH-Oxidierung über Cytochrom b_5 beeinflußt werden (13). Ein Synergismus zwischen NADH und NADPH ist ebenfalls mehrmals bestätigt worden (6, 9, 14, 18, 19, 79).

Daher ist anzunehmen, daß eine Stimulierung des ADH-abhängigen Äthanolabbaus wahrscheinlicher als eine Aktivierung peroxidatischer Vorgänge sein sollte, da auch die Beschleunigung konzentrationsunabhängig und linear verlief. Die Zugabe von Hexobarbital zu Kaninchenmikrosomen in vitro bewirkt eine Stimulierung der Wasserstoffperoxidbildung. Dagegen ergab sich bei Zusatz von Äthylmorphin keine Beeinflussung der Wasserstoffperoxidbildung. In vivo verlief aber die Äthanolelimination sowohl nach Zugabe von Hexobarbital wie nach Zugabe von Amidopyrin vergleichbar.

Katalase spielt vor allem bei höheren Äthanolkonzentrationen eine Rolle. Eine Eliminationsbeschleunigung sollte deswegen bei hohen Konzentrationen größer sein als bei niedrigen. Bei allen untersuchten Stoffen war aber die Beschleunigung konzentrationsunabhängig und verlief linear. Der Vorstellung, daß eher die ADH-Aktivität als H_2O_2-Katalase die Elimination beeinflußt, entsprach auch das Ergebnis des

Versuches mit Fruktose als positiver Kontrolle. Fruktose bewirkte eine kurzfristige Beschleunigung des Äthanolabbaus durch verstärkte Reoxidation von NADH und damit eine Stimulierung des ADH-abhängigen Metabolismus. Der Effekt würde durch Amidopyrin jedoch verstärkt, was auf die Anwesenheit eines $NAD^+/NADH_2$-unabhängigen Mechanismus hinweisen könnte.

Die Untersuchungen mit Phenobarbital ergaben auch keine eindeutigen Hinweise: Phenobarbital führte ebenfalls zu erhöhter Äthanolelimination, womöglich durch Vergrößerung des NAD/NADH-Quotienten. Dieser Befund wurde durch Hexobarbital nicht zusätzlich verstärkt. Ursache hierfür könnte auch eine Kompetition zwischen Phenobarbital und Hexobarbital sowie eine Sättigung des Systems durch Phenobarbital sein. Für beide Erklärungen sind die Voraussetzungen gegeben, denn der Phenobarbitalspiegel nach Vorbehandlung betrug in einem Fall 40 mmol/l, was einem hohen Blutspiegel entspricht. Ähnliche Versuche mit Meerschweinchen zeigten die gleichen Ergebnisse (Dissertation von L. Lehne, in Vorbereitung). Nach einem phenobarbitalfreien Intervall von 36 Stunden war eine stärkere Stimulierung vorhanden.

Bemerkenswert ist der Einfluß der Substrate auf den Äthanolspiegel: Sämtliche untersuchten Stoffe, außer Perfluoro-n-Hexan, führten zu einem erhöhten Äthanolblutspiegel. Dieser Befund könnte einerseits darauf beruhen, daß diese Substanzen in der Leber einem "first-pass-effect" unterliegen, wodurch die Äthanolkonzentration im Blut auf Kosten der Äthanolkonzentration in der Leber angestiegen und das Verteilungsvolumen verringert worden sein könnte. Zum anderen hätte eine Hemmung der Alkoholdehydrogenase, wie es für Äthylmorphin beschrieben wurde (20), zu einem erhöhten Spiegel führen können.

Diese Hemmung des Äthanolabbaus bei Meerschweinchen durch Äthylmorphin ist schwierig in Einklang mit der Äthylmorphin-bedingten Steigerung der Äthanolelimination zu bringen. Der K_i-Wert beträgt bei Kaninchen 8,5 mM; anders ist es beim Meerschweinchen, wo der K_i-Wert 1,2 mM beträgt und die Hemmung erkennbar wird. Die Interpretation des Äthylmorphineffektes über das H_2O_2-Katalase-System liegt hier nahe.

Pefluoro-n-Hexan, ein "Entkoppler", der in vitro nicht hydroxyliert wird und der die H_2O_2-Bildung deutlich stimuliert (73, 75, 76), hatte in vivo keinen Einfluß auf den Äthanolmetabolismus. Diese Tatsache hängt möglicherweise mit der schlechten Absorption dieses Stoffes nach intraperitonealer Injektion zusammen. Auch der Versuch, es mit Ultrabeschallung in Lösung zu bringen, hatte wenig Effekt.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß bei der Veränderung der Äthanolelimination die Beeinflußung der ADH im Vordergrund steht und eine peroxidatische Elimination eine geringere Rolle spielt als z.B. bei Meerschweinchen. Die zusätzliche Stimulierung durch Amidopyrin auf die mit Fruktose beschleunigte Äthanolelimation könnte jedoch auf eine gewisse Rolle der peroxidatischen Elimination hindeuten. Dies müßte allerdings weiter untersucht werden.

5.0 Zusammenfassung

Es wurde versucht, die in verschiedenen Spezies in vitro gefundene Stimulierung der mikrosomalen H_2O_2-Bildung der Leber auch in vivo am Kaninchen nachzuweisen. Da Wasserstoffperoxid im lebenden Organismus nicht direkt nachweisbar ist, bot sich als indirekter Nachweis die Äthanoloxidation über die peroxidatische Katalasereaktion an, für die H_2O_2 das Co-Substrat darstellt. Hierzu wurde der Äthanolblutspiegel bei männlichen Kaninchen untersucht, die folgende unterschiedliche Behandlung erhalten hatten:
In einer ersten Gruppe erhielten Tiere Äthanol i.p. (2,5 g/kg KG) ohne Vorbehandlung (Kontrolle).
In der zweiten Gruppe wurde Äthanol i.p. (2,5 g/kg KG) plus Amidopyrin i.p. (6,6 mg/kg KG) oder Äthylmorphin i.p. (10 mg/kg KG) oder Hexobarbital i.p. (7,4 mg/kg KG) oder Cyclohexan i.p. (42 mg/kg KG) oder Perfluoro-n-Hexan i.p. (169 mg/kg KG) ohne Vorbehandlung gegeben.
Eine dritten Gruppe von Tieren wurde eine Woche lang mit Phenobarbital i.p. (50 mg/kg KG) vorbehandelt, und es wurde nach einer Pause von 24 Stunden entweder allein Äthanol i.p. (2,5 g/kg KG) oder Äthanol i.p. (2,5 g/kg KG) und Hexobarbital i.p. (7,4 mg/kg KG) injiziert.
Zur Darstellung einer beschleunigten Äthanolelimination im Sinne einer positiven Kontrolle wurde einer vierten Gruppe von Tieren Fruktose i.p. (0,7 g/kg KG) während der Eliminationsphase von Äthanol oder Äthanol plus Amidopyrin gespritzt. Eine Vorbehandlung erfolgte dabei nicht.

Die Untersuchungen ergaben folgendes Resultat:

Die Äthanolelimination war unter Kontrollbedingungen linear und konzentrationsunabhängig und betrug 3,43 mM/h. Es wurde damit eine Eliminationskinetik nullter Ordnung bestätigt. Einen Übergang in eine Eliminationskinetik erster Ordnung konnte im untersuchten Bereich nicht nachgewiesen werden.

Die Eliminationsgeschwindigkeit wurde durch die Substrate Amidopyrin

(5,9 mM/h), Äthylmorphin (6,0 mM/h), Hexobarbital (5,6 mM/h) und Cyclohexan (5,9 mM/h) signifikant gesteigert. Die Beschleunigung war konzentrationsunabhängig. Die gleichen Substrate bewirkten einen erhöhten Äthanolblutspiegel. Die theoretische Anfangskonzentration (C_o) von Äthanol, 47,5 mM, wurde nach Zugabe von den Substraten Amidopyrin auf 61,8 mM, Äthylmorphin auf 61,9 mM und von Cyclohexan auf 64,3 mM signifikant erhöht. Hexobarbital bewirkte ebenfalls eine Erhöhung dieses Wertes, die aber nicht signifikant war.

Die lineare Eliminationsbeschleunigung ließ sich durch eine einwöchige Vorbehandlung mit Phenobarbital fast verdoppeln (6,3 mM/h gegenüber 3,4 mM/h bei der Kontrolle). Die Phenobarbitalvorbehandlung erhöhte ebenfalls die theoretische Anfangskonzentration und den Äthanolblutspiegel und senkte das Verteilungsvolumen. Die akute Zugabe von Hexobarbital zu phenobarbitalvorbehandelten Tieren konnte diese Werte nicht weiter verändern.

Durch Injektion von Fruktose während der Eliminationsphase von Äthanol ließ sich eine kurzfristige lineare Beschleunigung des Äthanolabbaus über 1,5 - 2 h erzielen, die durch Zusatz von Amidopyrin sich weiter steigern ließ. Die Beschleunigung betrug mit Fruktose 7,5 mM/h und mit Fruktose und Amidopyrin 9,7 mM/h. Gegenüber den Kontrollen war die Elimination fast verdoppelt. Durch die Gabe von Amidopyrin wurde der Abbau um zusätzlich 50 % gesteigert.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß in vivo der Nachweis einer Stimulierung der Wasserstoffperoxidbildung durch die hier gewählte indirekte Methode nicht eindeutig erfolgte. Es ist anzunehmen, daß die Beschleunigung der Äthanolelimination beim Kaninchen eher durch Beeinflussung der ADH zustande kam. Die erhöhte Anfangskonzentration ist durch einen First-pass-effect und Veränderungen in der Resorption zu erklären. Die Stimulierung der Fruktose-beschleunigten Elimination durch Amidopyrin um das annähernd doppelte zeigt die Anwesenheit eines NAD^+-unabhängigen Mechanismus an, der im Sinne einer gesteigerten H_2O_2-Bildung erklärt werden könnte.

Die Daten weisen über die hier angesprochene Problematik hinaus auf Mechanismen der Interaktion zwischen Äthanol, Arzneimitteln und anderen Fremdstoffen hin und haben von hier aus gesehen eine zusätzliche Bedeutung.

		Blutspiegelmaximum			Theoretische Anfangskonzentration		
Behandlung	n	mmol/l	S.D.	p	mmol/l	S.D.	p
Kontrolle	8	40,7	5,6		47,5	7,7	
Amidopyrin	7	51,7	3,3	<0,001	61,8	6,5	<0,005
Äthylmorphin	7	52,8	10,1	<0,005	61,9	10,4	<0,01
Hexobarbital	5	56,7	17,2	n.s.	60,5	14,6	n.s.
Perfluoro-n-Hexan	4	45,5	6,6	n.s.	50,3	6,3	n.s.
Cyclohexan	7	51,0	3,8	<0,005	64,3	4,4	<0,001

Tab. 1: Einfluß von Amidopyrin (6,6 mg/kg KG), Äthylmorphin (10 mg/kg KG), Hexobarbital (7,4 mg/kg KG), Perfluoro-n-Hexan (169 mg/kg KG) und Cyclohexan (42 mg/kg KG) auf das Blutspiegelmaximum und die theoretische Anfangskonzentration nach i.p. Injektion von 2,5 g Äthanol/kg KG.

		Invasionskonstante			Eliminationsgeschwindigkeit			Verteilungsvolumen		
Behandlung	n	h^{-1}	S.D.	p	V(mM/h)	S.D.	p	V_D(l/kg)	S.D.	p
Kontrolle	8	2,14	0,84		3,43	1,56		1,17	0,21	
Amidopyrin	7	2,56	1,04	n.s.	5,89	1,10	<0,005	0,89	0,10	<0,01
Äthylmorphin	7	2,23	0,92	n.s.	5,97	1,21	<0,005	0,90	0,15	<0,02
Hexobarbital	5	2,37	1,01	n.s.	5,55	1,07	<0,025	0,94	0,24	n.s.
Perfluoro-n-Hexan	4	2,22	0,85	n.s.	3,45	0,85	n.s.	1,09	0,14	n.s.
Cyclohexan	7	1,75	0,80	n.s.	5,94	0,52	<0,005	0,85	0,06	<0,005

Tab. 2: Einfluß von Amidopyrin (6,6 mg/kg KG), Äthylmorphin (10 mg/kg KG), Hexobarbital (7,4 mg/kg KG), Perfluoro-n-Hexan (169 mg/kg KG) und Cyclohexan (42 mg/kg KG) auf die Invasionskonstante, die Eliminationsgeschwindigkeit und das Verteilungsvolumen nach i.p. Injektion von 2,5 g Äthanol pro kg KG.

Zeit	Kontrolle			Äthylmorphin			Amidopyrin		
(h)	Konz. (mM)	S.D.	n	Konz. (mM)	S.D.	n	Konz. (mM)	S.D.	n
0,5	28.8	7.8	8	38.8	14.8	7	40.0	11.8	7
1.0	35.6	7.0	8	47.5	10.9	7	47.1	9.9	7
1.5	38.0	6.0	6	50.4	7.6	6	44.3	6.2	6
2.0	38.6	5.4	8	48.3	9.0	7	45.8	4.2	7
3.0	37.6	6.7	8	39.7	5.1	7	43.9	5.4	7
4.0	34.8	6.3	8	37.1	7.2	7	39.0	4.5	7
5.0	30.4	6.6	8	33.4	6.4	6	31.7	7.1	7
6.0	27.1	5.8	8	28.1	10.0	7	26.3	7.7	7
7.0	22.6	8.3	6	20.0	6.8	7	21.0	7.5	7
8.0	17.8	6.6	6	13.5	6.2	7	13.9	6.4	7

Tab. 3 Äthanolkonzentrationen in Hauskaninchen nach i.p.-Gabe von 2,5 g Äthanol/kg Körpergewicht in Kombination mit jeweils 10 mg Äthylmorphin/kg Körpergewicht, 6,6 mg Amidopyrin/kg Körpergewicht, 7,4 mg Hexobarbital/kg Körpergewicht, 160 mg Perfluoro-n-Hexan/kg Körpergewicht oder 42 mg Cyclohexan/kg Körpergewicht.
Kontolle: ohne Substanzzugabe

Zeit (h)	Hexobarbital Konz. (mM)	S.D.	n	Perfluoro-n-Hexan Konz. (mM)	S.D.	n	Cyclohexan Konz. (mM)	S.D.	n
0.5	40.4	17.2	5	31.6	12.2	4	31.5	9.1	7
1.0	48.8	22.9	5	37.4	9.0	4	46.7	7.2	7
1.5	45.2	15.6	5	41.1	8.4	3	50.2	2.6	6
2.0	49.0	13.8	5	41.1	6.8	4	48.4	4.0	7
3.0	42.1	8.1	5	37.8	6.9	4	47.2	4.3	7
4.0	35.4	11.8	5	37.5	7.0	4	41.7	2.2	6
5.0	32.7	10.6	5	36.8	6.4	4	35.4	2.9	6
6.0	26.7	9.5	5	33.2	5.7	4	30.3	5.2	7
7.0	21.2	9.1	5	30.1	7.4	4	25.2	5.8	7
8.0	16.5	7.3	5	24.7	8.3	4	19.6	4.8	7

Tab. 3 Fortsetzung

		Invasionskonstante		Eliminationsgeschwindigkeit			Verteilungsvolumen	
Behandlung	n	h^{-1}	S.D.	V(mmol/h)	S.D.		V_D(l/kg)	S.D.
Kontrolle	8	2,14	0,84	3,43	1,56		1,17	0,21
Hexobarbital	5	2,37	1,01	5,55	1,07		0,94	0,24
Phenobarbital-vorbehandlung	3	1,43	0,62	6,26	0,64	a)	0,93	0,07
Phenobarbital-vorbehandlung + Hexobarbital	3	12,15	18,16	6,08	1,36	b)	0,91	0,06

Tab. 4 Einfluß von Phenobarbitalvorbehandlung (50mg/kg KG/die eine Woche, 24 h Pause) und Phenobarbitalvorbehandlung und Hexobarbital (7,4mg/kg KG) auf die Invasionkonstante, die Eliminationsgeschwindigkeit und das Verteilungsvolumen nach i.p. Injektion von 2,5 g Äthanol/kg KG

a) $p < 0,02$ verglichen mit der Kontrolle
b) $p < 0,005$ " " " "

		Blutspiegelmaximum		Theoretische Anfangskonzentration	
Behandlung	n	mmol/l	S.D.	Co(mmol/l)	S.D.
Kontrolle	8	40,7	5,6	47,5	7,7
Hexobarbital	5	56,7	17,2	60,5	14,6
Phenobarbital-vorbehandlung	3	46,1	10,3	58,6	4,3 a)
Phenobarbital-vorbehandlung + Hexobarbital	3	55,8	11,6 b)	59,6	4,1 c)

Tab. 5: Einfluß von Phenobarbituratvorbehandlung (50 mg/kg KG/die eine Woche, 24 h Pause) und Phenobarbitalvorbehandlung und Hexobarbital (7,4 mg/kg KG) auf Blutspiegelmaximum und theoretische Anfangskonzentration nach i.p. Injektion von 2,5 g Äthanol pro kg KG bei Phenobarbitalvorbehandlung.

a) $p < 0,02$ verglichen mit der Kontrolle
b) $p < 0,005$ " " " "
c) $p < 0,005$ " " " "

7. Literatur

1. Berry, M.N., Fanning D.C., Griveli A.R., Wallace P.G.
Ethanol oxidation by isolated hepatocytes from fed and starved rats and from rats exposed to ethanol, phenobarbitone or 3-amino-triazole. No evidence for a physiological role of a microsomal ethanol oxidation system.
Biochem. Pharmacol. 29, 2161-2168, 1980

2. Berry M.N., Kun E.
Ethanol oxidation by isolated rat-liver cells. Stimulatory effects of fructose.
Europ. J. Biochem. 89, 237-241, 1978

3. Bode J.C., Thiele D.
Hemmung des Äthanolabbaus durch Fasten: Reversibiltät durch Fructoseinfusion.
Dt. med. Wschr. 100, 1849-1851, 1975

4. Bosron W.F., Ting-Kai Li
Alcohol dehydrogenase
in: Enzymatic basis of detoxification, Jacoby W.B. edt.
Academic Press 231-248, New York, 1980

5. Cederbaum A.I., Dicker E., Rubin E.
Transfer and reoxidation of reducing equivalents as the rate-limiting steps in the oxidation of ethanol by liver cells isolated from fed and fasted rats.
Arch. Biochem. Biophys. 183, 638-646, 1977

6. Cohen B.S., Estabrook R.W.
Microsomal electron transport reactions. III Cooperative interactions between reduced diphosphopyridine nucleotide and reduced triphospho-pyridine nucleotide linked reactions.
Arch. Biochem. Biophys. 143, 54-65, 1971

7. Cohen G., Cederbaum A.I.
Microsomal metabolism of hydroxyl radical scavenging agents: Relationship to the microsomal oxidation of alcohols.
Arch. Biochem. Biophys. 199, 438-447, 1980

8. Coon M.J., Ballou D.P., Haugen D.A., Krezoski S.O., Nordblom G.D., White R.E.
Purification of membrane-bound oxygenases: Isolation of two electrophoretically homogeneous forms of liver microsomal cytochrome P-450.
in: Microsomes and Drug Oxidations.
Ullrich V., Roots I. Hildebrandt A.G.. Estabrook R.W., Conney A.H. eds. 82-91, Pergamon Press, Oxford, 1977

9. Correia M. A., Mannering G.J.
Reduced diphosphopyridine nucleotide synergism of the reduced triphosphopyridine nucleotide-dependent mixed-function oxidase system of hepatic microsomes.
II. Role of the type I drug-binding site of cytochrome P-450
Molec. Pharmacol. 9, 470-485,1972

10. Dickenson C.J., Dickinson F.M.
Inhibition by ethanol, acetaldehyde and trifluoroethanol of reactions catalysed by yeast and horse liver alcohol dehydrogenases.
Biochem. J. 171, 613-627, 1978

11. Dost F.H.
Grundlagen der Pharmakokinetik, 122-130. Thieme Verlag Stuttgart 1968

12. Estabrook R.W., Hildebrandt A.G., Remmer H., Schenkman J.B., Rosenthal O., Cooper D.Y.
The role of cytochrome P-450 in microsomal mixed function oxidation reactions.
in Biochemie des Sauerstoffs. Bearbeitet von B. Hess und H.J. Staudinger, Springer Verlag Berlin, 142-177, 1968

13. Estabrook R.W., Hildebrandt A.G., Baron J.,Netter K.J., Leibman K.
A new spectral intermediate associated with cytochrome P-450 function in liver microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 132-139, 1971

14. Estabrook R.W., Werringloer J.
Active oxygen - Fact or fancy.
in Microsomes and Drug oxidations
Ullrich V., Roots I. Hildebrandt A.G.. Estabrook R.W., Conney A.H. eds. 748-756 Pergamon Press, Oxford, 1977

15. Favilla R., Cavatorta P.
Peroxidase activity of horse liver alcohol dehydrogenase in the presence of ß-NAD^+ and hydrogen peroxide.
FEBS Lett. 50, 324-329, 1974

16. Feytmans E., Morales M.N., Leighton F.
Effect of pyrazole on rat liver catalase.
Biochem. Pharmacol. 23, 1293-1305, 1974

17. Fischer H.D.
Der Einfluß von Barbituraten auf die Entgiftungsgeschwindigkeit des Äthanols.
Biochem. Pharmacol. 11, 307-314, 1962

18. Fujita S., Peisach J.
Electron transfer between liver microsomal cytochrome b_5 and cytochrome P-450 in the azo reductase reaction.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 78, 328-335, 1977

19. Gourlay G.K., Stock B.H.
Pyridine nucleotide involvement in rat hepatic microsmal drug metabolism.
II - Evidence for a co-operative interaction between NADPH and

NADH.
Biochem. Pharmacol. 27, 969-978, 1978

20. Heinemeyer G., Hildebrandt A.G., Roots I., Lehne L., Nigam S.
Demonstration of drug-ethanol interactions by changes in activity of hepatic microsomal oxidase/oxygenase cytochrome P-450 function.
Arch. Toxicol. 2, 491-496, 1979

21. Heinemeyer G., Hildebrandt A.G.
Type I-substrate binding and oxidase function of microsomal cytochrome P-450.
Suppl. to Arch. Pharmacol. 302, R 8, 1978

22. Heinemeyer G., Hildebrandt A.G., Roots I., Nigam S.
Stoichiometry of mixed function oxidase dependent hydroxylation of hexobarbital.
in: Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis I, 331-334
Coon M.J., A.H. Conney, R.W. Estabrook,H.V. Gelboin, J.R. Gillette and P.J. O'Brien eds. Academic Press, New York 1980

23. Heinemeyer G., Nigam S., Hildebrandt A.G.
Hexobarbital-binding, hydroxylation and hexobarbital-dependent hydrogen peroxide production in hepatic microsomes of guinea pig, rat and rabbit.
Arch. Pharmacol. 314, 201-210, 1980

24. Hildebrandt A.G., Speck M., Roots I.
The effects of substrates of mixed function oxidase on ethanol oxidation in rat liver microsomes.
Arch. Pharmacol. 281, 371-382, 1974

25. Hildebrandt A.G., Roots I.
Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)- dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reactions in rat liver microsomes.

Arch. Biochem. Biophys. 171, 385-397, 1975

26. Hildebrandt A.G., Tjoe M., Roots I.
Mono-oxygenase-linked hydrogen peroxide production and degradation in liver microsomal fractions.
Biochem. Soc. Trans. 3, 807-811, 1975

27. Hildebrandt A.G., Lehne L., Roots I., Tjoe M.
Alterations of hepatic microsomal mixed function oxygenase dependent H_2O_2 formation due to "uncoupling" and induction as demonstrated in vivo by elimination kinetics of ethanol in guinea pig.
in: Microsomes and Drug Oxidation
Ullrich V., Roots I., Hildebrandt A.G., Estabrook R.W. and Conney A.H. eds., Pergamon Press, Oxford, 492-499, 1977

28. Hildebrandt A.G., Heinemeyer G., Schlede E., Roots I.
Limitation of microsomal oxidase function by an active complex of NADPH, activator and microsomal protein.
in: Proceedings of 5th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidation and Drug Toxicity.
Sato R. and Kato R. eds., Japan Scientific Societies Press, New York, 211-212, 1982

29. Hildebrandt A.G., Heinemeyer G., Nigam S., Roots I.
Substrate and oxygen activation during hexobarbital metabolism.
Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis I, Coon M.J., A.H. Conney, R.W. Estabrook,H.V. Gelboin, J.R. Gillette and P.J. O'Brien eds. Academic Press, New York, 335-338, 1980

30. Hildebrandt A.G., Heinemeyer G., Roots I.
Stoichiometric cooperation of NADPH and hexobarbital in hepatic microsomes during the catalysis of hydrogen peroxide formation.
Arch. Biochem. Biophys. 216, 455-465, 1982

31. Hildebrandt A.G., Heinemeyer G., Bergs C., Roots I., Schlede E., Gundlach J., Abbas-Ali B., Eisele R.
Flavone stimulated hydrogen peroxide formation and benzo(a)pyrene hydroxylation in hepatic microsomes from animal and man.
im Druck

32. Ingelman-Sundberg M., Hagbjörk A.L., Ekström G., Terelius Y., Johansson I.
The cytochrome P-450 dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism. Implications in pharmacology and toxicology.
in: Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications.
Hietanen E., Laitinen M. and Hänninen O. eds., Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 19-26, 1982

33. Isselbacher K.J., Carter E.A.
Ethanol oxidation by liver microsomes: Evidence against a separate and distinct enzyme system.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 39, 530-537, 1970

34. Isselbacher K.J., Carter E.A.
Ethanol metabolism: Oxidative and peroxidative mechanisms.
Drug Metabolism and Deposition 1, 449-454, 1973

35. Jain N.C.
Direct blood-injection method for gaschromatographic determination of alcohols and other volatile compounds.
Clin. Chem. 17, 82-85, 1971

36. Jain N.C., Cravey R.H.
Analysis of alcohol.
II.A review of gas chromatographic methods.
J. Chromat. Sci. 10, 263-267, 1972

37. Jones D.P., Thor H., Andersson B., Orrenius S.:
Detoxification reactions in isolated hepatocytes. Role of

glutathione peroxidase, catalase and formaldehyde dehydrogenase in reactions relating to N-demethylation by the cytochrome P-450 system.
J Biol. Chem. 253, 6031-6037, 1978

38. Keilin D., Hartree E.F.
Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols.
Biochem. J. 39, 293-301, 1945

39. Koeppe P., Hamann C.
Zwei Methoden zur Parameterschätzung nichtlinearer Regressionsfunktionen bei fehlerbehafteten Messdaten.
EDV Med. Biol. 9, 112-117, 1978

40. Koop D.R., Morgan E.T.
Spectral and catalytic properties of ethanol-inducible cytochrome P-450 isoenzyme 3a.
in: Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications.
Hietanen E. Laitinen M. and Hänninen O. eds., Elsevier Biomedical Press B.V., Amsterdam, 269-275, 1982

41. Koop D.R., Nordblom G.D., Coon M.J.
Antibody to alcohol-inducible $P\text{-}450_{LM3a}$. A probe for the inducibility and catalytic activity of the isoenzyme.
in: 6th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations
Suppl. 1 to Xenobiotica, 14, 1984

42. Kumar A., Ravishankar H., Padmanaban G.
Studies on the biosynthesis and turnover of cytochrome P-450 in rat liver.
In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450.
Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Mode A., Rafter J. eds., 423-429, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1980

43. Lieber C.S., De Carli L.M.
Effect of drug administration on the activity of hepatic microsomal ethanol oxidizing system.
Life Sci., 9, II, 257-276, 1970

44. Lieber C.S., De Carli L.M.
The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 181, 279-287, 1972

45. Lieber C.S., De Carli L.M.
The significance and characterization of hepatic microsomal ethanol oxidation in the liver.
Drug Metab. Dispos., 1, 428-439, 1973

46. Lieber, C.S.
Metabolism of ethanol.
In: Metabolic Aspects of Alcoholism. Lieber, C.S. edt., 1-27, MTP-Press, Lancaster, 1977

47. Lu A.Y.H., West S.B.
Reconstituted mammalian mixed-function oxidases: Requirements, specifities, and other properties.
Pharmacol. Ther. 2, 337-358, 1978

48. Mannering G.J.
Hepatic cytochrome P-450-linked drug metabolizing systems.
in: Concepts in Drug Metabolism, Part B
Jenner P. and Testa B. eds., Dekker/INC, 53-166, 1981

49. Mezey E., Potter J.J., Reed, W.D.
Ethanol oxidation by a component of liver microsomes rich in cytochrome P-450
J. Biol. Chem., 28, 1183-1187, 1973

50. Mezey E.
Ethanol metabolism and ethanol drug interactions.
Biochem. Pharmacol. 25, 869-875, 1976

51. Nelson E.B., Kohl K.B., Masters B.S.S.
The role of NADPH-cytochrome c reductase in the microsomal oxidation of ethanol and methanol.
Drug Metab. Dispos. 1, 455-460, 1973

52. O'Brien P.J.
Hydroperoxides and superoxides in microsomal oxidations.
Pharmacol. Ther. 2, 517-536, 1978

53. Ohnishi K., Lieber C.S.
Reconstitution of the microsomal ethanol-oxidizing system. Qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption.
J. Biol. Chem., 252, 7124-7131, 1977

54. Orme-Johnson W.H., Ziegler D.M.
Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 21, 78-82, 1965

55. Oshino N., Chance B., Sies H., Bücher T.
The role of H_2O_2 generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors.
Arch. Biochem. Biophys. 154, 117-131, 1973

56. Oshino N., Oshino R., Chance B.
The characteristics of the "peroxidatic" reaction of catalase in ethanol oxidation.
Biochem. J., 131, 555-567, 1973

57. Oshino N., Jamieson D., Chance B.
The properties of hydrogen peroxide production under hyperoxic and

hypoxic conditions of perfused rat liver.
Biochem. J. 146. 43-65, 1975

58. Oshino N., Jamieson D., Tukasa S., Chance B.
Optical measurements of catalase-hydrogen peroxide intermediate (compound I) in the liver of anaesthesized rats and its implication to hydrogen peroxide in situ.
Biochem. J., 146, 67-77, 1975

59. Rahimtula A.D., O'Brien, P.
The role of cytochrome P-450 in the hydroperoxide-catalase oxidation of alcohols in rat liver microsomes.
Europ. J. Biochem. 77, 201-208, 1977

60. Rietbrock N., Abshagen U.
Pharmakokinetik und Stoffwechsel aliphatischer Alkohole.
Drug Res. 21, 1309-1319, 1971

61. Roach M.K., Reese W.N.jr., Creaven P.J.
Ethanol oxidation in the microsomal fraction of rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 596-602

62. Scholz R., Schwabe U., Plauk C., Nohl H.
The stimulatory effect on fructose of ethanol metabolism.
Suppl. 1 to Nutrition and Metabolism, 18, 79-92, 1975

63. Scholz R., Nohl H.
Mechanism of stimulatory effect of fructose on ethanol oxidation in perfused rat liver.
Europ. J. Biochem. 63, 449-458, 1976

64. Teschke R., Hasumura Y., Lieber C.S.
NADPH-dependent oxidation of methanol, ethanol, propanol and butanol by hepatic microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 851-857, 1974

65. Teschke R., Hasumura Y., Lieber C.S.
Hepatic microsomal alcohol-oxidizing system in normal and acatalasemic mice: its dissociation from the peroxidatic activity of catalase-H_2O_2.
Molec. Pharmacol. **11**, 841-849, 1975

66. Teschke R., Matsuzaki S., Onishi K., De Carli L.M., Lieber, C.S.
Microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): Current status of its characterization and its role.
Alcoholism: Clinical and Experimental Research, **1**, 7-15, 1977

67. Thurman R.G., Ley H.G., Scholz R.
Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase.
Europ. J. Biochem., 25, 420-430, 1972

68. Thurman R.G., Brentzel H.J.
The role of alcohol dehydrogenase in microsomal ethanol oxidation and the adaptive increase in ethanol metabolism due to chronic treatment with ethanol.
Alcoholism: Clinical and Experimental Research, **1**, 33-38, 1977

69. Thurman R.G., Hesse S., Scholz R.
The role of NADPH-dependent hydrogen peroxide formation and catalase in hepatic microsomal ethanol oxidation.
In: Metabolic Aspects of Alcoholism. Lieber, C.S., ed., 257-267, MTP-Press, Lancaster, 1977

70. Thurman R.G., Scholz R.
The role of hydrogen peroxide and catalase in hepatic microsomal ethanol oxidation.
Drug Metab. Dispos. **1**, 441-448, 1973

71. Tjoe-Reinhardt M.
Der Einfluß von Spezies und Induktion auf die NADPH-abhängige H_2O_2-Bildung in Lebermikrosomen.

Inauguraldissertation Medizinische Fachbereiche der Freien Universität Berlin, 1979

72. Ullrich V.
On the hydroxylation of cyclohexane in rat liver microsomes.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 350, 357-365, 1969

73. Ullrich V., Diehl H.
Uncoupling of monooxygenation and electron transport by fluorocarbons in liver microsomes.
Europ. J. Biochem., 20, 509-512, 1971

74. Ullrich V., Kremers P.
Multiple forms of cytochrome P-450 in the microsomal monooxygenase system.
Arch. Toxicol., 39, 41-50, 1977

75. Ullrich V., Kuthan H.
Autoxidation and uncoupling in microsomal monooxygenations.
In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450. Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Mode A., Rafter J. eds. 267-278, Elsevier Biomedical Press Amsterdam, 1980

76. Ullrich V.
The mechanism of cytochrome P-450 action.
In: Microsomes and Drug Oxidations
Ulrich V., Roots I., Hildebrandt A.G., Estabrook R. W., Conney A. H. eds., 192-199, Pergamon Press Oxford 1977

77. Vatsis K.P., Schulman M.P.
Absence of ethanol metabolism in "acatalatic" hepatic microsomes that oxidize drugs.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 52, 588-594, 1973

78. Videla L., Bernstein J., Israel Y.
Metabolic alterations produced in the liver by chronic ethanol

administration. Increased oxidative capacity.
Biochem. J. 134, 507-514, 1973

79. Werringloer J., Estabrook R.W.
Stimulation of NADH oxidation during NADPH dependent microsomal electron transport reactions.
Biochem. Biophys. Res Comm., 71, 834-839, 1976

80. Werringloer J., Chacos N., Estabrook, R.W., Roots I., Hildebrandt A.G.
Microsomal electron transport reactions: The formation and utilization of hydrogen peroxide as related to alcohol metabolism.
In: Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, II. Thurman, R.G., Williamson J.R., Drott, H.R. and Chance B. eds., 351-360, Academic Press New York, 1977

81. White R.E., Coon M.J.
Oxygen activation by cytochrome P-450.
Ann. Rev. Biochem. 49, 315-336, 1980

82. White R.E., Sligar S.G., Coon M.J.
Modes of oxygen activation by cytochrome P-450.
In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450. Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Mode A., Rafter J. eds. 307-314, Elsevier Biomedical Press Amsterdam, 1980

83. Widmark E.M.P.
Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlichen medizinischen Alkoholbestimmung.
Urban und Schwarzenberg, Berlin und Wien, 1932

Lebenslauf:

Geboren am:	8. 6. 1951 in Eksjö/Schweden
Eltern:	Lars Malmström, Chefarzt der Chirurgie Els-Marie Malmström, geb. Sander
Schulen:	1958 - 1962 Volksschule in Mölndal 1962 - 1967 Volksschule in Göteborg 1967 - 1971 Gymnasium, Göteborgs Högre Samskola
Abitur:	25. 5. 1971 in Göteborg
Studium:	1971 - 1972 Chemiestudium an der Universität zu Lund 1972 - 1978 Medizinstudium an der Freien Universität Berlin
Approbation:	16. 2. 1981 in Berlin
Assistenzzeit:	Nov. 1978 - Aug. 1982 Anästhesie im Klinikum Steglitz der FU Berlin

An dieser Stelle möchte ich denjenigen danken, die maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. A.G. Hildebrandt für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Ratschläge bei der Konzeption der Experimente, die verständnisvolle Einweisung in die theoretischen Hintergründe und fruchtbare Kritik bei der Abfassung des Manuskriptes.

Herrn PD Dr. med. I. Roots für seine ermutigende Hilfestellung bei der Versuchsplanung und seine Bereitschaft zur wissenschafltichen Diskussion.

Herrn Dr. med. G. Heinemeyer für seine stete Hilfsbereitschaft und vielen praktischen Ratschläge.

Frau G. Minarek, Frau G. Gruber, Frau E. Berg, Frau B. Schwaneberg und Frau I. Tinnes für technische Hilfestellung und für Ihre Geduld und

Herrn Prof. Dr. P. Köppe für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen